

IMMUNOPOTENTIATOR**Publication number:** JP6256208**Publication date:** 1994-09-13**Inventor:** YOSHIZAWA YASUKO; TSUNEHIRO ATSUSHI;
YAMAMOTO YUTAKA; ITO MASAO; MURAMATSU
SATSUKI; NOMURA KAZUYO**Applicant:** FOOD DESIGN GIJUTSU KENKYU KUM**Classification:****- international:** A61K31/70; A61K31/715; A61P37/04; C08B37/00;
C12P19/14; A61K31/70; A61K31/715; A61P37/00;
C08B37/00; C12P19/00; (IPC1-7): A61K35/80;
A61K31/70; A61K31/725; C08B37/00; C12P19/14**- european:****Application number:** JP19930067479 19930303**Priority number(s):** JP19930067479 19930303**Report a data error here****Abstract of JP6256208**

PURPOSE:To obtain an immunopotentiator having low viscosity, more excellent immunopotentiating activity and a state of improved utility, comprising a substance, prepared by treating an immunopotentiating acidic polysaccharide obtained from red algae with an enzyme, as an active ingredient. **CONSTITUTION:**A marine alga belonging to red algae consisting essentially of an acidic polysaccharide having agarose as a basic skeleton is used as a raw material. The acidic polysaccharide is extracted from the marine alga with an aqueous medium and subjected to solid-liquid separation to give an extracted solution. Then the prepared extracted solution is treated with beta-agarase capable of hydrolyzing the acidic polysaccharide to make the acidic polysaccharide into a low viscosity or the marine alga is brought into contact with an aqueous solution containing beta-agarase to extract the acidic polysaccharide and to simultaneously make the acidic polysaccharide into a low viscosity. Then the resulting substance is subjected to solid-liquid separation to give a solution or the solution is treated to purify the acidic saccharide to give a solution. A solid content essentially consisting of a low-viscosity acidic saccharide is obtained from the prepared solution. An immunopotentiator comprises the solid content as an active ingredient.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-256208

(43)公開日 平成6年(1994)9月13日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/80	Z	7167-4C		
31/70		8314-4C		
31/725		8314-4C		
C 0 8 B 37/00	G	7433-4C		
C 1 2 P 19/14	Z	7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-67479

(22)出願日 平成5年(1993)3月3日

(71)出願人 391018570

フードデザイン技術研究組合

東京都中央区日本橋小伝馬町17番17号 峰
澤金物ビル4階

(72)発明者 吉沢 康子

千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業
(株)総合研究所内

(72)発明者 常広 淳

千葉県船橋市日の出2-20-2 昭和産業
(株)総合研究所内

(74)代理人 弁理士 坂口 昇造

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫賦活剤

(57)【要約】

【構成】 紅藻類に属する海藻から酸性多糖を水性溶媒で抽出し、固液分離して得られる抽出液に該酸性多糖を加水分解する能力を有するβ-アガラーゼを作用させて酸性多糖を低粘性化して得られる溶液、もしくは該海藻を該β-アガラーゼを含有する水性溶媒と接触させて酸性多糖の抽出と同時にその低粘性化を行い、ついで固液分離して得られる溶液、または上記溶液を酸性糖を精製するための操作に付して得られる溶液中の、主として低粘性酸性糖よりなる固形分を有効成分として含有する免疫賦活剤。

【効果】 本発明の免疫賦活剤の有効成分である低粘性酸性糖は原料酸性多糖に比べ、低粘度で取扱い易く、各種の剤型に製剤化が可能であり、かつ免疫賦活作用が優れている。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 紅藻類に属する海藻から酸性多糖を水性溶媒で抽出し、固液分離して得られる抽出液に該酸性多糖を加水分解する能力を有するβ-アガラーゼを作用させて酸性多糖を低粘性化して得られる溶液、もしくは該海藻を該β-アガラーゼを含有する水性溶媒を接触させて酸性多糖の抽出と同時にその低粘性化を行い、ついで固液分離して得られる溶液、または上記溶液を酸性糖を精製するための操作に付して得られる溶液中の、主として低粘性酸性糖よりなる固形分を有効成分として含有する免疫賦活剤。

【請求項2】 精製操作がβ-アガラーゼ作用後の溶液に含まれる中性オリゴ糖の除去を含む請求項1記載の免疫賦活剤。

【請求項3】 紅藻類がオゴノリ属またはアマノリ属である請求項1または2記載の免疫賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は紅藻類から得られる免疫賦活性酸性多糖を酵素処理したものを有効成分とするより実用性に富んだ形態の免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 海藻類は日本では古くから食用として、また民間薬として用いられてきた。近年、その生理活性に注目した研究開発が行われるようになってきた。例えば、特開昭63-316732号公報には紅藻類由来の抗ウィルス剤が、また特開昭64-66126号公報には紅藻類由来の抗腫瘍剤が、それぞれ開示されている。さらに、特開平3-284626号公報及び特願平3-329870号（未公開）には、いずれも紅藻類であるアマノリ属及びオゴノリ属の海藻から水性溶媒で抽出される物質を有効成分とする免疫賦活剤がそれぞれ開示されている。オゴノリ属やアマノリ属に属する海藻から抽出される物質は、主としてアガロースを基本骨格に持つ高分子の酸性多糖を主成分とするものであることが知られている。これらの酸性多糖は粘性が高く、時によっては強いゲルを形成するため、これらの免疫賦活作用を利用して、ヒト、動物等の免疫機能を高めるために、食品や飼料に混合したり、これ自体を経口、非経口投与に適するような剤形に製剤することは極めて困難である。しかも製造工程での取扱いも難しく、操作が煩雑となるなどの大きな問題点があった。

【0003】 かかる酸性多糖を加水分解する酵素として、シュードモナス・アトランティカ (*Pseudomonas atlantica*)、サイトファーガ・エスピー (*Cytophaga* sp.)、ビブリオ・エスピー AP-2 (*Vibrio* sp. AP-2) 等が、該酸性多糖中のβ-1,4結合を加水分解する能力を有するβ-アガラーゼを生産することが報告されている (Biochem., 105, 317-321(1967), Chin. J. Oceanol. Limnol. 9 (2) 125-149 (1990) 等)。J. Biochem., 133, 673-6

また、β-アガラーゼを利用して海藻類からオリゴ糖を製造する方法が、特開平2-65788号、特開平4-271791号公報等において提案されている。他方、希酸による加水分解では該酸性多糖中のα-1,3結合が比較的選択的に切断される。しかし、酸による加水分解はこれら多糖に結合する硫酸基をも遊離させ、構成糖の基本構造をも変化させてしまう。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、かかる免疫賦活活性を有する、紅藻類起源のアガロースを基本骨格とする酸性多糖について、その粘度及びゲル形成能を低下させてヒトや動物等への投与に適した製剤を得る目的で鋭意研究を続けた。その結果、該酸性多糖類を加水分解する能力を有するβ-アガラーゼを該酸性多糖に作用させ、これを加水分解して得られる生成物が該酸性多糖に比しはるかに低い粘性を有し、かつより優れた免疫賦活活性を有することを見出し、本発明を完成した。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明は紅藻類に属する海藻から酸性多糖を水性溶媒で抽出し、固液分離して得られる抽出液に該酸性多糖を加水分解する能力を有するβ-アガラーゼを作用させて酸性多糖を低粘性化して得られる溶液、もしくは該海藻を該β-アガラーゼを含有する水性溶媒を接触させて酸性多糖の抽出と同時にその低粘性化を行い、ついで固液分離して得られる溶液、または上記溶液を酸性糖を精製するための操作に付して得られる溶液中の、主として低粘性酸性糖よりなる固形分を有効成分として含有する免疫賦活剤に関する。以下に本発明を詳しく説明する。

【0006】 本発明では、原材料としてアガロースを基本骨格に持つ酸性多糖を主成分として含有する紅藻類に属する海藻を用いる。好適に用い得る海藻としては、オゴノリ属に属する海藻、例えばオゴノリ、ツルシラモ、シラモ、オオオゴノリ、ミゾオゴノリ、カバノリ、アマノリ属に属する海藻、例えばマルバアマノリ、ツクシアマノリ、オニアマノリ、コスジノリ、ウップルイノリ、アサクサノリ、スサビノリ、マルバチシマクロノリ、オオノノリ、フイリタサを挙げることができる。この他ウシケノリ属のウシケノリ、フノリノウシゲも本発明に使用でき、またイトグサ属及びフノリ属に属する海藻のなかにも本発明に使用できるものがある。

【0007】 これらの海藻は最初から水性溶液による抽出に付しても活性成分を得ることもできるが、油分、少糖類、油溶性色素を除く意味でこれらを溶解し得る有機溶媒でまず海藻を処理するのがよい。かかる有機溶媒としては例えばメタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール等の低級アルカノール、アセトン等の低級アルカノン等を用いることができる。また、こ

であってもよい。メタノール、エタノール及びこれらと水との混合溶媒が好ましい。かかる有機溶媒（水との混合溶媒を含む）の使用量は特に制限はないが、海藻（乾燥物基準）100gに対して0.5～10Lぐらいが適当である。有機溶媒抽出の温度時間は特に制限はないが、室温以上例えば30℃～有機溶媒の沸点で5分以上例えば15分～1時間が適当である。

【0008】次に有機溶媒をデカント、濾過、遠心分離等で除去して得られる残渣を水性溶媒による抽出に付す。水性溶媒としては水、酸性水溶液または塩基性水溶液が用いられるが、少量の例えば10容量%以下の親水性有機溶媒をさらに含有していてもよい。「酸性」及び「塩基性」を与えるのは通常それぞれ酸及び塩基であるが、常用される緩衝剤であってもよい。酸としては特に制限はないが、塩酸、硫酸リン酸等の無機酸、酢酸、プロピオン酸、クエン酸等の有機酸を用いることができる。塩基としては特に制限はないが、アンモニア、アルカリもしくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸塩もしくは重炭酸塩、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等を通常使用する。塩基としてはさらにピリジン等の親水性有機塩基であってもよい。緩衝剤としてはトリス系、リン酸系、クエン酸系、ホウ酸系等の常用の緩衝剤を用いることができる。

【0009】水性溶媒のpHは特に制限はないが通常1～13、特に2～12が適当である。さらにpH3.5以下、特にpH3以下で得られた活性成分はそれより上のpHで得られる活性成分に比し一般に免疫賦活剤作用が強い。またpH3.5以下、特にpH3以下で処理する場合それより上のpHで処理する場合に比し、一般に活性成分の収率が優れている。水性溶媒の使用量は特に制限はないが通常原海藻（乾燥物基準）100gに対して1～10Lぐらいが適当である。水性溶媒による抽出の温度時間は特に制限はないが、4℃～系の沸騰温度、通常室温～系の沸騰温度で通常5分以上、例えば30分～20時間が適当である。なお、水、酸性水溶液、塩基性水溶液による抽出は2つ以上直列に組み合わせて行ってもよい（例えば水抽出残渣を酸性水溶液で抽出する等）。

【0010】抽出液を残渣の海藻から通常の固液分離手段（デカンテーション、濾過、遠心分離等）により分離し、ついで通常この段階で酵素処理に付す。抽出を酸性水溶液または塩基性水溶液を用いて行った場合には酵素処理に適したpHに調整した後酵素処理に付すか、または好ましくは一旦抽出液を中和し（中和に用いる塩基、酸はそれぞれ塩基性水溶液及び酸性水溶液に用いる塩基、酸でよい）、ついで脱塩処理（有機溶媒沈殿後水に溶解、透析、限外濾過等）を行った後に酵素処理に付す。

【0011】酵素処理に使用する酵素β-アガラゼとしては、前記紅藻類に含まれる酸性多糖を加水分解（β

ば、起源を問わず使用することができ、例えば先に例示したシュードモナス・アトランティカ、サイトファーガ・エスピー、ピブリオ・エスピーAP-2起源のβ-アガラゼを使用することができる。このうち、シュードモナス属の微生物を起源とするβ-アガラゼ製剤が市販されている。

【0012】酵素処理は、多糖1g当たりβ-アガラゼ0.01～50,000ユニット、より好ましくは0.1～1,000ユニットを、pH5～9、温度15～60℃で0.5～72時間、より好ましくは5～48時間作用させることにより行うことができる。反応は静置状態で進行させることができるが、攪拌し、さらにはpHを常に酵素反応が最も効率的に行える値に調整しながら行うこともできる。酵素反応後、通常酵素を加熱等により失活させる。上記酵素処理によって酸性多糖はそのβ-1,4結合が、通常部分的に、加水分解されて低粘性の酸性糖（酸性多糖+酸性オリゴ糖）になる。該酸性糖の分子量分布は通常300～1,400,000の範囲内の範囲である。なお、酵素処理は、上記においては水性溶媒抽出液に対して行っているが、水性溶媒抽出と同時に、すなわちβ-アガラゼ含有水性溶媒を用いて抽出を行うことにより行うこともできる。この場合には酵素反応条件は上記と同様でよいが、抽出条件は酵素反応条件による制約を受ける。また水性溶媒抽出液から酸性多糖を一旦後述の精製手段により精製し、ついで水に再溶解した後、β-アガラゼを作用させてもよい。

【0013】酵素処理液は、そのまままたは濃縮、乾燥して免疫賦活剤またはその有効成分として使用することもできるが、酸性糖を精製するための一般的処理に付してもよい。かかる精製処理としては除蛋白、中和、脱塩、有機溶媒添加による沈殿、塩析、透析、限外濾過、分配クロマトグラフィー、イオン交換樹脂処理、電気泳動等があり、これらは単独で、または通常組み合わせで用いられる。これらの精製処理は公知の方法（例えば特開平3-284626号記載の方法）に準じて行うことができる。

【0014】例えば、除蛋白はトリクロロ酢酸等により蛋白質、ポリペプチド等を沈殿させる等の手段により行うことができる。有機溶媒による沈殿は通常活性成分を溶解しないか少ししか溶解しない親水性有機溶媒を添加して有効成分を沈殿させることにより行う。かかる有機溶媒としては通常メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール等の低級アルカノール、アセトン等の低級アルカノン等を用いることができる。メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール等の低級アルカノールが好ましい。塩析工程に用いる塩析剤は硫酸、食塩、塩化カリ、炭酸バリウム等であるが、硫酸の使用が最も好ましい。また塩析工程の後処理（脱塩）として通常透析、限外濾過、ゲル濾過、逆浸透

組み合わせで行う

【0015】透析は通常セロファン膜、コロジオン膜などの半透膜を用いて行う。ゲル濾過はデキストランまたはポリアクリルアミドゲルなどを充填したカラムを用いて行う。セファデックス、パイオゲルの名称で販売されている充填剤が通常用いられている。限外濾過、逆浸圧法はいずれも加圧下で膜を用いて分画する方法である。前者は $0.5 \sim 5 \text{ kg/cm}^2$ 、後者は $20 \sim 35 \text{ kg/cm}^2$ で行うのが通常である。分配クロマトグラフィーについては疎水性基の結合した担体を用いた逆相分配クロマトグラフィーを用いて低分子分画を除去する、あるいは親水性基の結合した担体を用いた順相分配クロマトグラフィーを用いて極性の低い画分を除去する等の処理を行う。また、上記操作に加えて必要に応じイオン交換処理を行ってもよい。

【0016】酵素処理液からの酸性糖の精製において、低分子量物質、特に中性オリゴ糖（糖の重合度が10以 *

分子量分布

粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$) (50℃での値)

全糖含有量(w/w%)

蛋白質含有量(w/w%)

3,6-アンヒドロガラクトース含量(w/w%)

硫酸エステル含量(w/w%)

【0018】以上の精製操作を経て得られる低粘性酸性糖を含有する溶液はそのまま免疫賦活剤として用いることもできるが、通常、噴霧乾燥、凍結乾燥、熱風乾燥等から適宜選ばれる方法で乾燥し、それ自体としてまたは製薬上許容される種々の担体を混合した剤形で免疫賦活剤として用いる。経口投与の場合には、それに適用される錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などは、通常それらの組成物中に製剤上一般に使用される結合剤、滑沢剤、賦形剤、崩壊剤、湿潤剤のような添加物を含有する。また経口用液体剤として用いる場合は、内用水剤、振盪合剤、懸濁液剤、乳剤、シロップ剤の形態であっても良く、また使用する前に再溶解させる乾燥生成物の形態であってもよい。さらに、このような液体製剤は通常用いられる添加剤、保存剤のいずれを含有していても良い。注射用の場合には、その組成物は通常安定剤、緩衝剤、保存剤、等強化剤などの添加剤を含有し、通常単位投与量アンプルまたは多投与量容器の形態で提供される。なお、上記組成物は水溶液、懸濁液、溶液、油性または水性ビヒクル中の乳液のような形態であっても良く、一方活性成分は使用する前に適当なビヒクルたとえば発熱物質不含の滅菌した水で再溶解させる粉末であっても良い。

【0019】本発明の免疫賦活剤はヒトまたは動物、例えば免疫力が低下している人、特に高齢や疾病等により免疫機能が低下している人に経口または非経口的に投与される。経口投与は舌下投与を包含する。非経口投与は

*下) を除去することにより低粘性酸性糖の免疫賦活活性が飛躍的に増大することが判明した。中性オリゴ糖の除去は上記精製手段により行うことができるが、具体的には例えば、分画分子量が5,000 ~10,000の限外濾過膜（例えばミリポア社製PTGC膜、アドバンテック東洋社製QO100等）で排除される画分、または陰イオン交換樹脂（例えば、東ソー社製DEAE-トヨパール650M、ファルマシア社製Q-セファロースHP等）に保持されない画分として中性オリゴ糖の除去を行うことができる。また本発明の免疫賦活剤の有効成分である低粘性酸性糖を上記精製手段によって分画したもの（例えば免疫賦活性に特に寄与する分子量分画、酸性多糖分画等）を有効成分としてもよい。

【0017】以上の精製操作を経るか、また経ないで得られる低粘性酸性糖を含有する溶液中の固形分（免疫賦活の有効成分）は、後記分析法によるものとして、一般に次の物性を有する。

300 ~140 万の範囲内の範囲

1 ~40

60~95、好ましくは70~95

20以下、好ましくは5以下

5~33、好ましくは10~30

3.5 ~20、好ましくは4.5 ~15

発明の免疫賦活剤中の有効成分固形物の量は種々変えることができるが、通常5~100%(w/w)、特に10~60%(w/w)が適当である。本発明の免疫賦活剤の投与量は動物かヒトにより、また年齢、個人差、病状などに影響されるので、場合によって下記範囲外の量を投与する場合も生ずるが、一般にヒトを対象とする場合の経口投与量は活性成分固形物量として大人1日体重1kg当たり0.5~1,000mg、好ましくは1~300mgであり、1回または2もしくは3回に分けて投与する。なお本免疫賦活剤活性成分（具体的には各実施例で得られる乾燥物）の急性毒性はいずれもLD₅₀（ICR系マウス、経口投与）>3g/kgであった。また、本免疫賦活剤活性成分は多量に摂取しても生体に悪影響を与えない利点を有することから、そのまま、または種々の栄養分等を加えて、もしくは飲食品中に含有せしめて免疫賦活作用の機能をもたせた機能性食品、健康食品として食してもよい。すなわち、例えば各種ビタミン類、ミネラル類等の栄養分を加えて、例えば栄養ドリンク、豆乳、スープ等の液状の食品や各種形状の固形食品、さらには粉末状としてそのままあるいは各種食品へ添加して用いることもできる。かかる機能性食品、健康食品としての本免疫賦活剤中の有効成分の含有量、摂取量はそれぞれ上記製薬における含有量、投与量と同様でよい。

【0020】

【実施例】

参考例1

(v/v) 温メタノールで繰り返し洗浄した。この繰り返し洗浄は該メタノール 500mlを加え、45~50℃で15分間攪拌し、ヌツツェで濾過する操作を2回繰り返すことにより行った。洗液を十分に除去した後、蒸留水 1.5リットルを加え、沸騰水浴中で30分間、適宜攪拌しながら抽出した。抽出液を遠心分離により回収し、残渣に再び蒸留水を1リットル加え、同様に加温抽出し、抽出液を回収した。得られた抽出液を合わせ、ヌツツェで吸引濾過して固形成分を完全に除去した。得られた濾液に99.5%エタノールを加え良く攪拌した後、1晩放置し沈澱を十分に析出させた。沈澱を回収し、蒸留水に膨潤溶解後、凍結乾燥して乾燥物 4.86gを得た(試料A)。なお、「原藻」は通常、市場にはアルカリ溶液で煮た物が塩蔵して出回っているため、かかる処理をしていないものという意味で使用した。なお、かかる市場品からも本発明の免疫試活剤の有効成分を得ることができる。

【0021】実施例1

参考例1で得られた乾燥物(試料A) 1gを蒸留水に溶解し(0.1%)、シュードモナス属由来β-アガラーゼ(シグマ社製) 1,000 ユニットを加えて30℃に保温し適宜攪拌しつつ、48時間反応させた。反応液を沸騰水浴中で15分間加熱して酵素を失活させた後凍結乾燥し、酵素処理物を得た(試料B)。

実施例2

実施例1と同様に操作して得た酵素反応液を熱失活させた後、公称分画分子量5,000の限外濾過膜(日本ミリポア・リミテッド製)で10倍に限外濾過濃縮した。処理後、蒸留水を加えて10倍に希釈して上記膜処理を再度行い、得られた濃縮液を凍結乾燥して乾燥物を得た(試料C)。

【0022】実施例3

オゴノリ原藻50gを十分量の水で洗浄後、さらに85%(v/v) 温メタノールで参考例1と同様にして繰り返し洗浄した。洗液を十分に除去した後、蒸留水 1リットルを加え、沸騰水浴中で30分間、攪拌抽出した。抽出液を30℃まで冷却し、シュードモナス属由来のβ-アガラーゼ(シグマ社製) 5,000ユニットを加え、30℃に保温し適宜攪拌しながら24時間反応させた。反応終了後熱失活を施し、ヌツツェで吸引濾過して固形成分を除去した。濾液にトリクロロ酢酸を終濃度が10%となるように加え、氷水中で30分保持した後、セライトでプリコートしたヌツツェで吸引濾過し、濾液を回収した。濾液を2N水酸化ナトリウムで中和後、セファデックスG-25を充填したカラムで脱塩し、凍結乾燥して乾燥物6.37gを得た(試料D)。

【0023】参考例2

スサビノリ原藻50gを粉砕し、85%(v/v) 温メタノールで参考例1と同様にして繰り返し洗浄した。洗液を十分

に除去した後、蒸留水0.75リットルを加え、沸騰水浴中で30分間、攪拌抽出し、遠心分離により沈澱を回収した。沈澱は0.5リットルの蒸留水で洗浄した後、1リットルの蒸留水を加え、濃塩酸でpHを2に調整し、室温で1晩放置した。抽出液をヌツツェで吸引濾過して固形成分を除去し、得られた濾液を2N水酸化ナトリウムで中和後、4倍量の99.5%エタノールを加え良く攪拌し、1晩放置し沈澱を十分に析出させた。沈澱を回収し、蒸留水に膨潤溶解後、凍結乾燥して乾燥物4.1gを得た(試料E)。

【0024】実施例4

参考例2で得られた乾燥物(試料E) 1gを蒸留水に溶解し(0.1%)、シュードモナス属由来β-アガラーゼ(シグマ社製) 2,000 ユニットを加えて30℃に保温し適宜攪拌しつつ、48時間反応させた。反応液は、前記と同様に加熱失活と凍結乾燥を行い、酵素処理物を得た(試料F)。

実施例5

実施例4と同様に操作して得た酵素反応液を熱失活させた後、DEAE-トヨパール650Mカラム(1.6×20cm)のせ、蒸留水 200ミリリットルで洗浄後、保持された画分を0.5M塩化ナトリウムで溶出した。溶出液は濃縮後、セファデックスG-25を充填したカラムで脱塩し、濃縮後、凍結乾燥を行って乾燥物0.6gを得た(試料G)。

実施例6

実施例4と同様に操作して得た酵素反応液を熱失活させた後、公称分画分子量5000の限外濾過膜(日本ミリポア・リミテッド製)で10倍に限外濾過濃縮した。処理後、蒸留水を加えて10倍に希釈して上記濃縮操作を再度行い、得られた濃縮液を凍結乾燥して乾燥物を得た(試料H)。

【0025】参考例1~2及び実施例1~6で得られた乾燥物の各種分析結果を表1に示した。なお、分析項目中の全糖はフェノール硫酸法(Dubois M. et al.: Anal. Chem., 28, 350-356(1956))を用い、ガラクトンとして算出した。蛋白質はローリー法(Lowry O.H. et al.: J. Biol. Chem., 193, 265-275(1951))を用いて、3,6-アンヒドロガラクトースはW. Yapheらの方法(Yaphe W. et al.: Anal. Biochem., 13, 143-148(1965))で、それぞれ測定した。硫酸エステルは酸加水分解後、遊離した硫酸イオンをイオンクロマトグラフィー・システムにて測定した。分子量はGPCによりプルランを基準として測定した。粘度は1.0%の水溶液について、表1のものでは50℃、表2のものでは25℃で、それぞれB型粘度計を用いて測定した。

【0026】

【表1】

分 析 項 目	試料 A (参考例 1)	試料 B (実施例 1)	試料 C (実施例 2)	試料 D (実施例 3)
分子量分布	50万～ 140万	300 ～ 140万	3,000～ 140万	5,000～ 140万
粘度 (mPa · s)	57.5	25.0	32.2	35.0
全糖含量 (w/w%)	85.4	84.2	80.3	78.5
蛋白質含量 (w/w%)	1.6	1.6	1.9	3.2
3,6-アミノ 糖ラクトース含量 (w/w%)	29.0	27.9	24.2	30.3
硫酸エステル含量 (w/w%)	8.2	7.9	9.3	7.5

【0027】

* * 【表2】

分 析 項 目	試料 E (参考例 2)	試料 F (実施例 4)	試料 G (実施例 5)	試料 H (実施例 6)
分子量分布	30 万～ 80 万	300 ～ 10万	5,000～ 10万	3,000～ 10万
粘度 (mPa · s)	6.4	1.4	2.0	1.7
全糖含量 (w/w%)	82.2	83.2	79.5	82.7
蛋白質含量 (w/w%)	1.4	1.5	0.5	1.5
3,6-アミノ 糖ラクトース含量 (w/w%)	24.7	25.1	18.4	20.3
硫酸エステル含量 (w/w%)	4.9	4.8	8.5	7.5

【0028】実施例7（酵素分解試料のマクロファージ活性化作用）

免疫賦活作用の指標としてマクロファージ活性化作用を調べた。常法によりプロテオースペプトンで誘導したマウスの腹腔細胞を採取し、 4×10^5 /ウェルとなるよう96穴プレートに分注し、1時間培養してマクロファージを付着させた。浮遊細胞を除去した後試料を加え10%牛胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む RPMI-1640培地中で72時間培養し、培養上清中の残存グルコー

ス及び分泌された亜硝酸イオン濃度を測定し、マクロファージ活性化の指標とした。すなわち、グルコース消費量と亜硝酸イオン産生量は、いずれも値の大きい程マクロファージ活性化作用が大きいことを示す。対照としてマクロファージ活性化物質であるリボポリサッカライド (LPS) 及びラミナリンを用いた。結果を表3に示した。

【0029】

【表3】

試料	添加濃度 $\mu\text{g/ml}$	グルコース消費量 mg/well	亜硫酸イオン産生量 nmol/well
コントロール	—	0.12 ± 0.01	1.8 ± 0.2
L P S	5	0.36 ± 0.01	13.3 ± 0.9
ラミナリン	500	0.31 ± 0.01	5.2 ± 0.6
試料 A	500	0.32 ± 0.03	2.5 ± 0.1
試料 B	500	0.32 ± 0.01	13.9 ± 2.6
コントロール	—	0.11 ± 0.00	1.2 ± 0.2
L P S	5	0.34 ± 0.01	15.0 ± 1.5
ラミナリン	500	0.30 ± 0.02	2.7 ± 0.5
試料 E	500	0.29 ± 0.01	3.0 ± 0.4
試料 F	500	0.28 ± 0.02	4.8 ± 0.4
試料 G	500	0.32 ± 0.01	8.4 ± 0.8
試料 H	500	0.34 ± 0.01	8.4 ± 0.8

【0030】表3から明らかなように、酸性多糖を酵素処理することにより、マクロファージの亜硝酸産生能が著しく上昇し、グルコース消費量は殆どそのまま維持された。このことは、酵素処理により免疫能が増強されることを如実に示すものである。

【0031】実施例8 注射剤

試料C 600g
ポリエキシエチレン硬化ヒマシ油 500g
局方蒸留水 10リットル
上記成分を用い常法により注射剤を調製し、1アンプルに5ミリリットルずつ充填した。

実施例9 カプセル剤

試料D 200g
コーンスターチ 150g
タルク 80g
ステアリン酸マグネシウム 30g

上記成分を十分混和し、60メッシュの金網を通過させて粒度を調整した後、1,000個のゼラチンカプセルに充填した。

【0032】

【発明の効果】本発明の免疫賦活剤の有効成分である低粘性酸性糖は原料酸性多糖に比べ、低粘度で取扱い易く各種の剤型に製剤化が可能であり、かつ免疫賦活作用がより優れている。

フロントページの続き

(72)発明者 山本 緯
愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工業(株)内
(72)発明者 伊藤 昌雄
愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工業(株)内

(72)発明者 村松 五月
愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工業(株)内
(72)発明者 野村 和代
愛知県安城市昭和町19-10 新日本化学工業(株)内